

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 4 月 8 日 (08.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/028556 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 38/17, 38/22, 45/00, 47/42, A61P 9/00, 9/10, 43/00
- (74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO, Selji et al.); 〒100-6036 東京都千代田区霞が関3丁目2番5号霞が関ビル36階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012139
- (22) 国際出願日: 2003 年 9 月 24 日 (24.09.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-279058 2002 年 9 月 25 日 (25.09.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社メドジェル (MEDGEL CORPORATION) [JP/JP]; 〒612-8043 京都府京都市伏見区本材木町668番地3 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田畑 泰彦 (TABATA, Yasuhiko) [JP/JP]; 〒611-0024 京都府宇治市琵琶台3-8-16 Kyoto (JP). 米田 正始 (KOMEDA, Masashi) [JP/JP]; 〒602-8024 京都府京都市上京区室町通樺木町下ル大門町256 御所西アーバンライフ303 Kyoto (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SUSTAINED RELEASE PREPARATION FOR TREATING CORONARY STENOSIS OR OBSTRUCTION

(54) 発明の名称: 冠状動脈狭窄または閉塞治療用徐放性製剤

(57) Abstract: A medicinal composition for treating coronary stenosis or obstruction which comprises a sustained release preparation containing an angiogenesis factor or a gene encoding the same and a gelatin hydrogen. As the angiogenesis factor, use can be made of bFGF or other FGFs, VEGF, HGF, PDGF, TGF, angiopoietin, HIF, cytokines, chemokines, adrenomedullins, etc.

(57) 要約: 血管新生因子またはこれをコードする遺伝子およびゼラチンハイドロゲルを含む徐放性製剤からなる、冠状動脈狭窄または閉塞を治療するための医薬組成物が開示される。血管新生因子としては、例えば、bFGFおよびその他のFGF、VEGF、HGF、PDGF、TGF、アンギオポイエチン、HIF、サイトカイン、ケモカイン、アドレナメジュリン等を用いることができる。



WO 2004/028556 A1

明細書

冠状動脈狭窄または閉塞治療用徐放性製剤

技術分野

- 5 本発明は、冠状動脈狭窄または閉塞治療用の徐放性製剤に関する。より詳細には、本発明は、心臓の栄養動脈である冠状動脈の狭窄あるいは閉塞の治療のための血管新生因子含有徐放性製剤およびその製法、ならびにそれを用いた冠状動脈狭窄または閉塞の新しい治療法に関する。

10 背景技術

- 心臓外科領域においては、冠状動脈の狭窄にて起こる心筋虚血つまり狭心症と、病変進行の結果起こる心筋梗塞は、その早期発見と適切な治療が患者の生命を左右する重篤な疾患である。特に心筋梗塞は日本成人3大死因の一つであり、より効果的な治療の開発は急務である。降圧薬、血管拡張剤等の循環改善剤の投与によりこれらの病気の進展を遅らせることはできても、これはあくまで補助手段に過ぎず、根本治療ではない。狭窄・閉塞した血管に対し直接的な治療方法として、冠動脈病変部位を機械的に押し広げる内科的カテーテル治療があるが、これには再狭窄の問題が伴うとともに、動脈硬化が強い場合にはその治療に限度がある。この場合残された治療方法は、外科的に血液供給源となる他の血管を病変箇所よりも遠位側に繋ぎ、新たな血液路（バイパス）を作成する冠動脈バイパス手術である。しかし直径が1 mm未満の微少血管には技術的に吻合が困難であり、うまくバイパスしてもその血管径の違いや血流量不足から早期閉塞の運命を辿る。また直径1.5 mmまたはそれ以上の血管はバイパス手術の適応であるが、その末梢部や枝血管（とくにそれらの直径が小さいとき）に他の狭窄があると、バイパスの効果は低くなりその開存率も良くない。

狭窄病変を複数の冠状動脈にび漫性に持つ重症の狭心症患者は、現段階では有効な治療方法がない為その予後は非常に不良である。虚血性心機能不全に伴う多臓器不全が併発した場合は致命的である。この危機的状況を打開する目的で、現段階で内科的（PCIまたはPTCA・ステントなどのカテーテルインターベン

ション)・外科的(ACバイパスまたはCABG、オフポンプCABGまたはOPCABなど)治療が適応とならない細血管が灌流する心筋領域に種々の血管新生因子を筋肉注射したり冠動脈内に注入する、あるいはレーザーで心臓外側から小孔を開けることで心筋内の側副血行の発達を促進する治療が開始されはじめて

5 いるが、依然その効果は十分でない。いずれの方法にしても新生される血管は元来備わっている心筋内の血管の交通を拡充するに過ぎず、これにより増加する血液量は収縮力の低下した心機能を回復するには不十分である。したがって、当該技術分野においては、冠動脈に十分な血液を供給するための新たな治療法の開発が求められている。

10 本発明に関連する先行技術文献情報としては以下のものがある：

WO94/27630；JP A 2001-316285；JP A 2002-145797。

本発明は、心筋領域における血管新生を促進することにより冠動脈狭窄または閉塞を治療するための新規な方法およびこれに用いるための製剤を提供することを目的とする。

15

発明の開示

本発明者らは、ゼラチンハイドロゲルを用いて作製した血管新生因子の徐放性製剤が、心筋梗塞モデルウサギにおいて顕著な治療的効果を有することを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、血管新生因子またはこれをコードする

20 遺伝子およびゼラチンハイドロゲルを含む徐放性製剤からなる、冠動脈狭窄または閉塞を治療するための医薬組成物を提供する。本発明はまた、血管新生因子またはこれをコードする遺伝子およびゼラチンハイドロゲルを含む徐放性製剤を用いることを特徴とする、冠動脈狭窄または閉塞を治療する方法を提供する。好ましくは、血管新生因子はbFGFである。

25

本発明にしたがって、bFGFをゼラチンハイドロゲルに含浸させたシートを心筋虚血部位と多数の分枝を有する胃大網動脈の間に挟み込み徐放させることにより、血管新生効果を得られ、心臓外の血管から新生血管が誘導され、血流が増加して虚血改善が計られる。すなわち、本発明の徐放性製剤を用いることにより、心臓の外部から血管が誘導されるため、上記の細血管に従来の吻合方法(直径1.

5 mm以下とくに1 mm以下の血管では成績が極めて悪い) を用いずにバイパスを繋ぐ、いわば” バイオバイパス (Bio-bypass)” を形成させることが可能となった。本発明は、重症の虚血性心疾患治療剤として特に有用である。

本発明の徐放性製剤は、胃大網動脈 (Gastroepiploic artery) ないし大網 (greater omentum) と冠動脈 (coronary artery) またはその枝あるいは毛細血管とのバイパス (吻合)、左または右内胸動脈 (left or right internal thoracic artery) と冠動脈またはその枝あるいは毛細血管とのバイパス (吻合)、および、左または右とう骨動脈 (left or right radial artery) と冠動脈またはその枝あるいは毛細血管とのバイパス (吻合) において用いるのに有用である。

腹腔内で腸管を包み込むように存在する毛細血管の豊富な結合組織である大網は右胃大網動脈を主要栄養動脈としている。この右胃大網動脈は冠動脈バイパス術のグラフト (新しい血液供給路) として汎用されており遠隔期開存率に優れる質の高い血管である。本発明の好ましい態様においては、徐放化した増殖因子を心臓と大網を含んだ右胃大網動脈の間に挟み込むように置き、この主要動脈から心筋へ血管を萌芽するバイオバイパスを形成させる。バイオバイパスによる血流増加は心筋内の側副血行発達のための血流増加よりも豊富であると考えられ、高い治療効果が期待される。これによりこれまで内科的、外科的に治療不可能とされていた重症虚血心の治療適応が拡大され、心不全や狭心痛に悩まされている患者に大きな福音をもたらす可能性がある。特に、心移植適応患者のなかで虚血性心筋症の患者にも有効である可能性がある。

さらに、本発明にしたがえば、その他の動脈グラフト素材 (生体内の血管において最も質の高い内胸動脈や大きな血管径を持つ撓骨動脈など)、さらには組織工学や遺伝子工学により改良された静脈グラフトや各種人工血管において適用することも可能であり、従来の外科治療と組み合わせることで幅広い治療戦略の展開が可能となる。

すなわち、本発明の徐放性製剤は、静脈グラフト (大伏在静脈または小伏在静脈または上腕の静脈ないしそれらを組織工学的・遺伝子工学的に改良したもの)

と冠動脈またはその枝あるいは毛細血管とのバイパス（吻合）、人工血管グラフト（ゴアテックス（登録商標）（PTFE）またはダクロンなどと、それらを組織工学的・遺伝子工学的に改良したもの）と冠動脈またはその枝あるいは毛細血管とのバイパス（吻合）、および生物系グラフト（ヒト動脈、静脈、動物由来の動脈、静脈あるいはそれらを脱細胞など組織工学的あるいは遺伝子工学的に改良したもの）と冠動脈またはその枝あるいは毛細血管とのバイパス（吻合）において用いるのにも有用である。

発明の詳細な説明

10 本発明において用いることができる血管新生因子の例としては、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor: bFGF）およびその他のFGF、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、肝細胞増殖因子（HGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、トランスホーミング増殖因子（TGF）、アンギオポイエチンなどの増殖因子、およびVEGF
15 の発現を誘導する活性を有する低酸素誘導因子（HIF）等、ならびに、血管新生作用をもつサイトカイン、ケモカイン、アドレナメジュリンなどが挙げられる。

本発明において血管新生因子として好ましいものはbFGFである。bFGFは、繊維芽細胞（3T3）の増殖を促進する因子として最初に下垂体および脳から同定された成長因子である（Rifkin and Moscatelli,
20 J. Cell Biol. 109, 1-6, 1989）。bFGFは、種々の組織および臓器において、血管新生、平滑筋細胞成長、小食治癒、組織修復、造血、神経細胞の分化等の多岐にわたる機能を有することが見いだされている（Bikfalvi, et al., Endocrine Rev., 18, 26-45, 1997）。bFGFは、欧米では虚血性心疾患の血管
25 新生療法に臨床治療レベルで使用されており、日本では皮膚科領域では既に皮膚潰瘍治療薬として商品化され、整形外科領域では臨床治験で使用されている。

本発明で使用されるゼラチンは、牛、豚、魚類などを始めとする各種の動物種の皮膚、骨、腱などの身体のあらゆる部位から採取できるコラーゲン、あるいはコラーゲンとして用いられている物質から、アルカリ加水分解、酸加水分解、お

よび酵素分解等の種々の処理によって変性させて得ることができる。遺伝子組換え型コラーゲンの変性体ゼラチンを用いてもよい。ゼラチンの性質は、用いる材料および処理方法により様々であるが、そのいずれの性質をもつゼラチンも本発明においてbFGF等の血管新生因子の徐放のためのハイドロゲル材料として利用することができる。

ゼラチンの性質を表す尺度としては、例えば、等電点、分子量、ジータ電位などがある。ジータ電位は、物質（ゼラチン）の静電的な荷電の程度を表す尺度である。本発明において用いるのに特に好ましいゼラチンは、以下の物性：

コラーゲンからのアルカリ加水分解処理によって得られる、酸性ゼラチンであり、
10 分子量が、SDS-PAGEの非還元条件下で約10～約20万ダルトンであり、
水溶液中のジータ電位が、約-15～約-20mV

を有するゼラチンである。また好ましくは、ウシの骨由来のI型コラーゲンをアルカリ処理して調製した酸性ゼラチンを用いることができ、新田ゼラチン社の試料等電点（IEP）5.0として入手することもできる。なお、酸処理して調製
15 した塩基性ゼラチンは同じく新田ゼラチン社の試料IEP9.0として入手することができるが、ジータ電位は以下のように大きく相違する。

酸性ゼラチン（新田ゼラチン社試料IEP5.0）：約-15～約-20mV

塩基性ゼラチン（新田ゼラチン社試料IEP9.0）：約+12～約+15mV

本発明で使用されるゼラチンハイドロゲルとは、上記ゼラチンを用いて種々の
20 化学的架橋剤とゼラチン分子間に化学架橋を形成させて得られるハイドロゲルのことである。化学的架橋剤としては、例えばグルタルアルデヒド、例えばEDC等の水溶性カルボジイミド、例えばプロピレンオキサイド、ジエポキシ化合物、水酸基、カルボキシル基、アミノ基、チオール基、イミダゾール基などの間に化学結合を作る縮合剤を用いることができる。好ましいものは、グルタルアルデヒド
25 である。また、ゼラチンは、熱処理、紫外線照射、放射線照射、電子線照射などによって化学架橋することもできる。また、これらの架橋処理を組み合わせ用いることもできる。さらに、塩架橋、静電的相互作用、水素結合、疎水性相互作用などを利用した物理架橋によりハイドロゲルを作製することも可能である。

ゼラチンの架橋度は、所望の含水率、すなわちハイドロゲルの生体吸収性のレ

ベルに応じて適宜選択することができる。ゼラチンハイドロゲルを調製する際のゼラチンと架橋剤の濃度の好ましい範囲は、ゼラチン濃度1～20w/w%、架橋剤濃度0.01～1w/w%である。架橋反応条件は特に制限はないが、例えば、0～40℃、1～48時間で行うことができる。一般に、ゼラチンおよび架橋剤の濃度、架橋時間が増大するとともにハイドロゲルの架橋度は増加し、生体吸収性は低くなる。

ゼラチンハイドロゲルの形状は、治療において用いるのに適した物であれば特に制限はないが、例えば、シート状、円柱状、角柱状、ディスク状、ペースト状、球状、粒子状などがある。

- 10 円柱状、角柱状、シート状、ディスク状のゼラチンハイドロゲルは、ゼラチン水溶液に架橋剤水溶液を添加するか、あるいは、架橋剤水溶液にゼラチンを添加し、所望の形状の鑄型に流し込んで、架橋反応させることにより調製することができる。また、成形したゼラチンゲルにそのまま、あるいは乾燥後に架橋剤水溶液を添加してもよい。架橋反応を停止させるには、エタノールアミン、グリシン
- 15 等のアミノ基を有する低分子物質に接触させるか、あるいは、pH2.5以下の水溶液を添加する。反応に用いられた架橋剤および低分子物質を完全に除去する目的で、得られたゼラチンハイドロゲルは、蒸留水、エタノール、2-プロパノール、アセトン等により洗浄し、製剤調製に供される。

- 球状、粒子状のゼラチンハイドロゲルは、例えば、三口丸底フラスコに固定した攪拌用モーター（例えば、新東科学社製、スリーワンモーター、EYELA miniD. C. スターラー等）とテフロン（登録商標）用プロペラを取り付け、フラスコと一緒に固定した装置にゼラチン溶液を入れ、ここにオリーブ油等の油を加えて200～600rpm程度の速度で攪拌し、W/O型エマルジョンとし、これに架橋剤水溶液を添加するか、ゼラチン水溶液を予めオリーブ油中にて前乳化
- 20 （例えば、ボルテックスミキサーAdvantec TME-21、ホモジナイザー、polytron PT10-35等を用いて）しておいたものをオリーブ油中に滴下し、微粒子化したW/O型エマルジョンを調製し、これに架橋剤水溶液を添加して架橋反応させ、遠心分離によりゼラチンハイドロゲルを回収した後、アセトン、酢酸エチル等で洗浄し、さらに2-プロパノール、エタノール等に浸漬して架橋反応を
- 25

停止させることにより、調製することができる。得られたゼラチンハイドロゲル粒子は、2-プロパノール、Tween 80を含む蒸留水、蒸留水等で順次洗浄し、製剤調製に供される。ゼラチンハイドロゲル粒子が凝集する場合には、例えば、界面活性剤などの添加あるいは超音波処理（冷却下、1分以内程度が好ましい）等を行ってもよい。

得られるゼラチンハイドロゲル粒子の平均粒径は、上述の粒子作製時におけるゼラチン濃度、ゼラチン水溶液とオリーブ油との体積比、および攪拌スピードなどにより変化する。一般には粒径は1~1000 μm であり、目的に応じて適宜必要なサイズの粒子をふるい分けて使用すればよい。さらに、前乳化することによって、粒子サイズが20 μm 以下の微粒子状のゼラチンハイドロゲルを得ることができる。

球状、粒子状のゼラチンハイドロゲルを調製する別法として以下の方法も挙げられる。上記の方法と同様の装置にオリーブ油を入れ、200~600 rpm程度の速度で攪拌し、ここにゼラチン水溶液を滴下してW/O型エマルジョンを調製し、これを冷却後、アセトン、酢酸エチル等を加えて攪拌し、遠心分離により未架橋ゼラチン粒子を回収する。回収したゼラチン粒子を、さらにアセトン、酢酸エチル等、次いで2-プロパノール、エタノール等で洗浄後、乾燥させる。この乾燥ゼラチン粒子を0.1% Tween 80を含む架橋剤水溶液に懸濁させ、緩やかに攪拌しながら架橋反応させ、使用した架橋剤に応じて0.1% Tween 80を含む100 mM グリシン水溶液又は0.1% Tween 80を含む0.004 N HCl等にて洗浄し、架橋反応を停止することによりゼラチンハイドロゲル粒子を調製することができる。本法で得られるゼラチンハイドロゲル粒子の平均粒径は上記の方法の場合と同様である。

本発明のゼラチンハイドロゲルは適宜、適当な大きさ及び形に切断後凍結乾燥し滅菌して使用することができる。凍結乾燥は、例えば、ゼラチンハイドロゲルを蒸留水に入れ、液体窒素中で30分以上、又は-80℃で1時間以上凍結させた後に、凍結乾燥機で1~3日間乾燥させることにより行うことができる。

以下に、bFGFを例として、本発明の血管新生因子含有徐放性製剤の製造方法をおよび使用方法を説明する。bFGF以外の血管新生因子を用いて本発明の

徐放性製剤を製造および使用する方法は、本明細書の開示ならびに当該技術分野においてよく知られる技術に基づいて明らかであろう。

本発明で使用されるbFGFは、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば、種々の方法で調製されたものを用いることができ、また既に市販されている製品を使用してもよい。bFGFの製造法としては、例えば、bFGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養上清等から分離、精製して該bFGFを得ることができる。あるいは遺伝子工学的手法によりbFGFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えbFGFを得ることもできる。(例えば、Nature, 342, 440 (1989)、特開平5-111382号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 967 (1989)などを参照)。上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、酵母、昆虫、かいこ、または動物細胞などを用いることができる。このようにして得られたbFGFは、天然型bFGFと実質的に同じ作用を有する限り、そのアミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されていてもよく、また同様に糖鎖が置換、欠失及び／又は付加されていてもよい。

本発明のbFGF含有徐放性ゼラチンハイドロゲル製剤は、例えば、上記の凍結乾燥したゼラチンハイドロゲルにbFGFを滴下して、ハイドロゲル内にbFGFを含浸させることにより得ることができる。この含浸操作は、通常、4-37℃で15分間-1時間、好ましくは4-25℃で15-30分間で終了し、その間にハイドロゲルはbFGFで膨潤し、bFGFがゼラチン分子と相互作用することによってゼラチン分子と複合体を形成し、ゼラチンハイドロゲル内に物理的相互作用によって固定される。bFGFとゼラチンとの間の複合体の形成には、両者の間の静電的相互作用だけでなく、疎水結合、水素結合等の他の相互作用も大きく寄与していると考えられる。

ゼラチンに対するbFGFの重量比は約5倍量以下であることが好ましい。さらに好ましくは、ゼラチンに対してbFGFは約5～約1/10⁴倍量の重量比

である。

本発明のbFGF徐放性ゼラチンハイドロゲル製剤は、bFGFの徐放性効果と安定化効果を持つため、bFGFの機能を少量で長時間にわたって発揮し得る。そのため、投与部位においてbFGFの血管新生促進機能が効果的に発揮されることによりバイオバイパスが形成され、冠状動脈狭窄または閉塞の治療剤として有効に作用することができる。

この徐放のメカニズムは、bFGFが、ハイドロゲル内のゼラチンに物理的に固定化されていることに基づく。本発明者らは、これまで、成長因子、サイトカイン、モノカイン、リンホカイン、その他の生理活性物質などの生体吸収性高分子ハイドロゲルを用いた徐放化を試み、これにより他の材料では達成できない生理活性を有した有効成分の徐放化とその徐放期間のコントロールに成功してきた。本発明においては、bFGFが同様のメカニズムによってハイドロゲルから徐放されると考えられる。ゼラチンハイドロゲルに固定化された状態では、bFGFはハイドロゲルからほとんど放出されない。生体内でハイドロゲルが分解されるにつれて、ゼラチン分子が水可溶性となり、それに伴って、ゼラチン分子に固定化されているbFGFが放出されるようになる。すなわち、ハイドロゲルの分解によって、bFGFの徐放性を制御することができる。ハイドロゲルの分解性は、ハイドロゲル作製時における架橋程度を調節することにより変えることができる。また、bFGFがゼラチンと相互作用することによって、これらの生体内での安定性、例えば酵素分解抵抗性などが向上する。

本発明のゼラチンハイドロゲルは、その含水率が徐放性に大きく影響し、好ましい徐放性効果を示す含水率としては約80～99w/w%が挙げられる。さらに好ましいものとしては、約95～98w/w%のものが挙げられる。この架橋度の測定可能な指標に含水率がある。含水率が大きければ架橋度は低くなり、分解されやすくなる。つまり、この含水率の値がbFGFの徐放（徐々に放出）を左右する。

本発明の徐放性製剤は、血管新生因子をコードする遺伝子を含むものであってもよい。このような遺伝子は、細胞に導入されることによりその細胞内で機能を発現することができるような形態で用いる。例えば、導入された細胞内で当該D

NAが転写され、それにコードされる血管新生因子が発現されるように構築されたプラスミドとして用いる。好ましくは、プロモーター領域、開始コドン、所望の機能を有する蛋白質をコードするDNA、終止コドンおよびターミネーター領域が連続的に配列されている。

- 5 このようなプラスミドは、当該技術分野において入手可能な種々のプラスミドに所望の血管新生因子をコードする遺伝子を適当な制限酵素部位を利用して挿入することによって調製することができる。導入すべき遺伝子の塩基配列を基に合成、半合成の手段により調製することも可能である。

- 10 血管新生因子をコードする遺伝子を含むゼラチンハイドロゲルは、蛋白質である血管新生因子について上述した方法と同様にして作製することができる。例えば、ゼラチンの5～30重量%水溶液に直接架橋剤を添加して調製した架橋ゼラチンゲル、あるいは架橋剤水溶液に未架橋ゼラチンゲルを浸漬して調製した架橋ゼラチンゲルを遺伝子を含む溶液中に直接浸漬するか、あるいは架橋ゼラチンゲルを乾燥した後、それを遺伝子を含む溶液中で再膨潤させることによ
- 15 って調製することができる。核酸は負に荷電しているため、正に荷電しているゼラチンハイドロゲルを用いることが好ましい。

- 本発明の徐放性製剤は、冠動脈の近傍に外科手術により留置するか注射により投与することができる。具体的には、胃大網動脈ないし大網と冠動脈との間、左または右内胸動脈と冠動脈との間、左または右とう骨動脈と冠動脈との間等に留
- 20 置または投与することができる。本発明の徐放性製剤が生体内で徐々に分解するのにもなって血管新生因子が放出され、血管新生因子の作用によりこれらの血管と冠動脈またはその枝あるいは毛細血管との間に新生血管が誘導され、バイオバイパスが形成される。このことにより、虚血心臓への血流が増加し、冠状動脈狭窄または閉塞の有効な治療を達成することができる。

- 25 あるいは、静脈グラフト（大伏在静脈または小伏在静脈または上腕の静脈ないしそれらを組織工学的・遺伝子工学的に改良したもの）、人工血管グラフト（ゴアテックス（登録商標）（PTFE）またはダクロンなどと、それらを組織工学的・遺伝子工学的に改良したもの）、および生物系グラフト（ヒト動脈、静脈、動物由来の動脈、静脈あるいはそれらを脱細胞など組織工学的あるいは遺伝子工

学的に改良したもの)等を用いて冠動脈バイパス手術を行う際に、本発明の徐放性製剤を病変部位またはその近傍に留置することができる。この場合にも、本発明の徐放性製剤が生体内で徐々に分解するのにもなって血管新生因子が放出され、血管新生因子の作用によりこれらのグラフトと冠動脈またはその枝あるいは毛細血管との間に新生血管が誘導され、バイオバイパスが形成されて血流が増加する。さらに、本発明の徐放性製剤は、人工血管グラフトと細胞移植(心筋細胞、骨格筋芽細胞、骨髄細胞ないし骨髄由来細胞、骨髄単核球細胞、ES細胞およびそこから分化させた細胞など)を使用したバイパス手術においても有効に用いることができる。

- 10 本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。また、本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願2002-279058号の明細書および図面に記載の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。

15 実施例

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

実施例1. bFGF含有ゼラチンハイドロゲルの作製

- 20 10wt%濃度の酸性ゼラチンをグルタルアルデヒドにより化学架橋した後、架橋剤を不活性化した。次に蒸留水にて数回洗浄し、架橋含水率90.3%ゼラチンハイドロゲルを得た。続いて100 μ gのbFGFを含む0.05M濃度のリン酸緩衝液(pH7.4, PBS500 μ l)を滴下し、bFGF水溶液をゼラチンハイドロゲルへ浸み込ませることによってbFGF含浸ゼラチンハイドロゲルを得た。

25 実施例2. 心筋梗塞ウサギモデルの作成および治療

体重2.5-3.5kgの日本白色ウサギを用いて、全身麻酔下に胸骨正中切開で心臓を露出した。抗不整脈剤を投与下に冠動脈の枝(回旋枝)を結紮し、心筋梗塞モデルを作製した。術後心室細動に移行することがあり、約20分間経過を観察し状態が安定することを待った。

次に、これらの心筋梗塞ウサギモデルに、b F G F含有ゼラチンハイドロゲルによる治療を施した。

グループA (n = 5) : 無処置 (心筋梗塞作成のみ)

5 グループB (n = 10) : 開腹し採取した大網を含んだ右胃大網動脈を心臓に巻き付ける

グループC (n = 10) : シート状のb F G F含有ゼラチンハイドロゲルを右胃大網動脈と心臓の間に投与する

10 b F G Fの投与は、これを含有させたハイドロゲルシートを細い糸で心臓表面に固定することにより行った。これらの条件下では、b F G Fは約2週間にわたり局所で徐放される。

実施例3. 超音波検査による心臓機能評価

15 術前、2週目、4週目の超音波検査で心臓機能評価を行った。軽い鎮静下に体表超音波検査を施行した。いずれの群も手術前の心機能は良好であり、差はなかった。2週目、4週目でグループCにおいて有意に心臓収縮能が良好であり、心機能が保たれていることが判明した。

実施例4. 大網動脈造影検査による評価

20 術後4週目にグループB, Cについて大網の動脈の造影検査を行った。グループB, Cのそれぞれ6匹ずつに造影検査を施行した。全身麻酔下に抗凝固を施し再開腹した。大網動脈に24Gカテーテルを挿入した。動物を犠牲死させ、大網と心臓を一塊に取り出した。あらかじめ挿入しておいたカテーテルより造影剤を注入し、これを撮影した後に、現像したフィルムを解析した。

25 グループBでは6匹中2匹において大網動脈から冠動脈が描出されたが、その新生血管発育は非常に乏しいものだった。一方グループCでは6匹全部において冠動脈への交通を認め、新生血管は非常に豊富であり冠動脈との交通を全てに認めた。

実施例5. 組織学的検査による評価

4週間の治療期間の後、心臓標本を摘出し、心筋梗塞の範囲を組織学的に検討した。また免疫染色を行い、梗塞境界部位の毛細血管の数を調べ比較検討した。摘出した心臓を冠動脈結紮部位より2mm心尖部よりで心臓長軸に対して水平断

にスライスした。これをマッソン・トリクローム染色し、左心室全体に占める心筋梗塞領域を算出した。

梗塞領域については、グループCはA, Bに比べ有意に小さかった。免疫染色（血管壁の α アクチン平滑筋細胞を染色）による細動脈の単位面積当たりの数は、

5 グループCが他の2群に比較し有意に増加していた。

以上の結果から、bFGF含有ゼラチンハイドロゲルによる血管新生作用により、心臓外の血管が冠動脈と連結し（バイオバイパス）、虚血心臓の血行改善が得られることで、有意に心機能の悪化を予防し、心筋梗塞領域を縮小させることができた。

請求の範囲

1. 血管新生因子またはこれをコードする遺伝子およびゼラチンハイドロゲルを含む徐放性製剤からなる、冠状動脈狭窄または閉塞を治療するための医薬組成物。
- 5 2. 血管新生因子がb F G Fである、請求項 1 記載の医薬組成物。
3. 血管新生因子またはこれをコードする遺伝子およびゼラチンハイドロゲルを含む徐放性製剤を用いることを特徴とする、冠状動脈狭窄または閉塞を治療する方法。
- 10 4. 血管新生因子がb F G Fである、請求項 3 記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12139

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/17, 38/22, 45/00, 47/42, A61P9/00, 9/10, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/17, 38/22, 45/00, 47/42, A61P9/00, 9/10, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1992	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-1992	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-145797 A (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.), 22 May, 2002 (22.05.02), Full text (Family: none)	1,2
A	JP 2001-316285 A (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.), 13 November, 2001 (13.11.01), Full text (Family: none)	1,2
A	WO 94/27630 A1 (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.), 08 December, 1994 (08.12.94), Full text & EP 702959 A1	1,2



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

*

"A"

Special categories of cited documents:
document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E"

earlier document but published on or after the international filing
date

"L"

document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O"

document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P"

document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 October, 2003 (23.10.03)

Date of mailing of the international search report

04 November, 2003 (04.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12139

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	IKEDA, Tadashi et al., Experimental Study of "Bio-CABG": a New Method to Revascularize Small Coronary Arteries, July 2003, Vol.23, No.7, pages 1768 to 1772	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12139

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 3, 4

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 3, 4 involve methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).


Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K38/17, 38/22, 45/00, 47/42, A61P9/00, 9/10, 43/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K38/17, 38/22, 45/00, 47/42, A61P9/00, 9/10, 43/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1926-1992 日本国公開実用新案公報 1971-1992 日本国登録実用新案公報 1994-1996 日本国実用新案登録公報 1996-2003		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2002-145797 A (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.) 2002.05.22 全文 (ファミリーなし)	1,2
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 23.10.03	国際調査報告の発送日 04.11.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 岩下 直人	4C 9841 
電話番号 03-3581-1101 内線 3451		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2001-316285 A (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.) 2001. 11. 13 全文 (ファミリーなし)	1, 2
A	WO 94/27630 A1 (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.) 1994. 12. 08 全文 & EP 702959 A1	1, 2
PX	IKEDA, Tadashi et al, Experimental Study of "Bio-CABG" : a New Method to Revascularize Small Coronary Arteries, July 2003, Vol.23, No.7, pages 1768-1772	1, 2

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 3, 4 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 3, 4 は手術または治療による人体の処置方法を包含するものであるので、
PCT 第 17 条 (2) (a) (i) 及び PCT 規則 39.1 (iv) の規定により、この国際調査機関が調査する
ことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしてい
ない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に
従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求
の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追
加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納
付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載
されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。